

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - 12

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1988

③ 日本国特許庁(JP)

④ 特許出願公開

⑤ 公開特許公報(A)

昭63-119500

⑥ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑦ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※審査請求 未請求 発明の頁 5 (全13頁)

⑧ 発明の名称 硫酸化多糖体DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑨ 特 願 昭62-125443

⑩ 出 願 昭62(1987)5月22日

⑪ 優先権主張 ⑫ 昭61(1986)5月23日 ⑬ 日本(JP) ⑭ 特願 昭61-118847

⑮ 発 明 者 井 上 和 弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑯ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑰ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑱ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

⑲ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

ガラクトース標準)

1. 発明の名称

蛋白含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

硫酸化多糖体DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

リン法、牛血清アルブミン標準)

2. 特許請求の範囲

(4) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する硫酸化多糖体DS 4152。

〔α〕_D²⁰ $-37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)28000 \pm 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

には殆ど不溶。

N 0.51~0.59% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(7) 显色反応

(3) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビ

糖含量(%) : 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレフト反応およびローリー・フォリン反応

特開昭63-119500(2)

は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応およびユニヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陽性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 濃度水溶液)

(9) 構成糖および炭酸基、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 $3O_2N_2$

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

加水分解物のアミノ酸分析計による分析

で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シ

アミノピロリン酸、グルコサミンおよびムラ

ミン酸の存在を認める。

水の薬品第5項記載の血管新生抑制剤。

2 炭酸化多糖体DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する沈着薬剤。

3 発明の詳細を説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な炭酸化多糖体DS 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び沈着薬剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び沈着薬剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、*Staphylococcus aureus* AT-25の発酵生成物中に細胞障害作用、免疫抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多糖体DF 4639が存在することが知られて

2 炭酸化多糖体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

1 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児糖尿病に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4 炭酸化多糖体DS 4152を有効成分として含有する沈着薬剤。

5 炭酸化多糖体DS 4152と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6 ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

7 リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、糖尿病性関節炎、未熟児糖尿病に有効な特許請

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-35329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多糖体DF 4639について生物学的特性を明らかにすべく検討をかねた結果、DF 4639が強い発癌性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をかねたところ、DF 4639は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのDS 4152と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び沈着薬作用を有することを発見した。

更にまた、本発明者は、この DS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の知見に基くものであり、その目的は、新規な免疫化多糖体 DS 4152 を提供することである。

また、本発明の他の目的は、免疫化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供することである。

更に、本発明の他の目的は、免疫化多糖体 DS 4152 とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供することである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、癌の

発育、実体形成、転移の増進等に極めて重要だけでなく、関節リウマチを含む慢性炎症、免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態においてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を弱めることをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する諸疾患、例えばリウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の免疫化多糖体 DS 4152 は、アルスロバクター sp. AT-25 (工業技術院放生

物工業技術研究所には、Microsome sp. AT-25 として、FERM P-5255 及び Arthrofactor sp. AT-25 として FERM BP-1357 の番号で登録されている) の培養物から分離される DF 4639 (特開昭 60-67301 号参照) から、その中に含まれる分子量約 1.5×10^6 以上の免疫性物質等を適当な分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈降法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によれば DF 4639 を適当なゲルろ過担体、例えば、セファクリル (Sepharose 3-300 (ファルマシア製)) を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィー

(東洋ソーダ製 03000 SW カラム使用) を行い、排除限界 (ボイド・ボリューム、void volume) にピークを示すフラクション (B 画分) とボイド・ボリュームにピークを与えず分子量約 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ の範囲に移出されるフラクション (L 画分) を各々集め、透析する。

また、限外ろ過は適当な膜 (例えば Amicon 社製の YM10、YM30、XM50、PM30 や Millico 社製の NOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50 等特に YM10) を用い、窒素ガスによる加圧またはペリステリク (peristaltic) ポンプによつて加圧 (0.5 ~ 5 kg/cm² 程度) し、透過液を DS 4152 として集めればよい。使用溶媒は、水-エタ

特開昭63-119500(4)

ノール(10:2~3)または水が適量であり、4で乃至重層で行なうのが一般的である。

得られた各透析内液を蒸発後ろ過し、ろ液を数倍量のエタノール中に沈降下注ぐことにより生成する白色沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とするDs 4152(1面分)と脂溶性物質(2面分)が各々得られる。

こうして得られるDs 4152は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

- (1) 分子量(ゲルろ過法による)
22000±3000
- (2) 元素分析値(500°Fの巾を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 着色反応

フェノール-硫酸、アンスロシン-硫酸、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびユンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8(3%濃度水溶液)

(9) 構成糖および炭水化物、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 SO_4Na およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(3) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 5.7 ± 3 (フェノール-硫酸法、ガラクトース標準)

蛋白含量(%): 1 ± 0.5 (ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

(4) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840 (肩), 810 (cm^{-1} ; KBr)

(6) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルムに不溶。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シリン酸、アミノピロリン酸、グルコサミンおよびムツニン酸の存在を認める。

以上のDs 4152は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、Ds 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、プレドニゾン、6-α-メチルプレドニゾン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、炎症性疾患、関節炎、ハムスト

特開昭63-119500(5)

一類に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1308(1979) J. Hall, Cancer Inst. 57 769(1976)及びProc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176(1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、糖質コルチコイド(プレドニゾン、プレドニソン、メタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が抗乳癌薬として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Carcinoma 10 72(1984))。

ゾロンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、フオスフェート、ブチルアセテート、テトラヒドロフタレート、トリメチルアセテート等)；メチルプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート等)；メタメタゾンおよびその誘導体(フオスフェート、ペレレート等)が挙げられる。

また、グルコルチコイドのC-11位の水素置換がα配置になつた異性体(たとえば、11α-エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルコルチコイドのテトラヒドロ代謝物(グルコルチコイド活性の有無は関係ない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の08 4152と適合せ用いることのできるステロイド剤は、糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

(1) プレグナンを母核とするステロイドホルモンの、すなわちグルコルチコイドであり、たとえばコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ウンデシレート等)；ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、カプロエート等)；プレドニゾンおよびその誘導体；プレドニ

メドロキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)、デイドロゲステロンおよびその17α-アセトキシ誘導体(デュフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メナロコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメチルアセテート、エナンテート、フェニルプロピオネート等)も挙げられる。

(2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモンの、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、ブチレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストノールおよび

特開463-119500 (8)

その誘導体、ミピナオスタンがあげられる。

さらにフルオキシメステロンおよびその誘導体、メタルテストロンおよびその誘導体、ステノロンおよびその誘導体も含まれる。

(3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、非雄ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体(ペンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等)、エストラジオールおよびその誘導体(トリプロピオネート等)があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を医薬的に許容される媒体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の塩液用製剤に溶解させた液剤、散剤、錠剤

剤、錠剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤がDS 4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して混合剤とすることも、あるいは両成分を含む混合剤とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、動脈内、経口、皮下、直腸内、粘膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン剤、副腎コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが適当で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適当

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(a)

特開458-67301号に記載の方法により得られたDP 4639 (50%)を1.5Mの0.1M NaCl に溶解し、これを0.1M NaCl で平衡化したカラム(セファクリルS-300; $50 \times 80 \text{ cm}$)にかけて同溶媒にて溶出し、1.8Mずつ溶出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル透過クロマトグラフィー(東洋ソーダ製 93000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5)を行い、ポイド・ポリュームにピークを与えず、

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適当である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌薬剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明のDS 4152はそれ単独であつても血管新生抑制作用を奏するが、これを更にステロイド剤と混合せるとより優れた血管新生抑制作用を奏する。

したがつて、DS 4152単独であつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と混合させたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば癌腫血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として有

特開昭63-119500(7)

DS 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を DP 4639 と比較して示す。

(a) 糖、蛋白、S および P 含量 (第1表)

第1表

	1) 糖 (%)	2) S (%)	3) 蛋白 (%)	4) P (%)
DS 4152	56	11.1	1.1	0.88
DP 4639	54	10.8	1.3	0.86
H 成分	42	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-硫酸法 (ガラクトース換算)

2) アントノボラスの方法 (C.A. Antonopoulos, *Anal. Chem. Suppl.* 16, 1521 (1962)) による

3) ローリー・フォリン法 (牛血清アルブミン換算)

4) ケエンらの方法 (P.S. Keen et al., *Anal. Chem.* 28, 1756 (1956)) による。

分子量 (ゲルペルメータグラム法) が約 2×10^5 ~ 8×10^5 の範囲に抽出されるフラクションを集め (約 700 ml)、脱イオン水に対して透析した。透析液を約 50 ml まで濃縮後ろ過した。ろ液を約 400 ml のエタノール中へ投下し、生成した沈殿を集め、これを 90% エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥 (50℃, 6 時間) して目的物の DS 4152 の白色粉末 3.8 g を得た。

一方、上記高速ゲル透過クロマトグラフィーでポリド・ポリリウムにピークを与えるフラクションを集め (約 90 ml)、上述の DS 4152 の場合と同様に処理して、H 成分を白色粉末として 0.18 g を得た。

(b) ガラクトース、グルコース、炭水素および糖の構成モル比

試体を 1 規定塩酸中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、炭水素および糖のモル比は、S および P の含量 (%) から算出した。

第2表

	ガラクトース	グルコース	炭水素	糖
DS 4152	61	10	73	0.6
DP 4639	62	10	73	0.6
H 成分	62	10	69	0.6

第2表は、グルコースを 10 モルとした場合

の各成分のモル比の 1 例である。

(c) 構成アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152 を 3 規定塩酸中、100℃ で 16 時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソロシン酸、グルタミン酸およびアラニン等のピークを認め、

(d) 比旋光度: $(\alpha)_D^{25}$ ($c=0.5$, 水)

第3表

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
H 成分	-34

(e) ゲル透過層出パターン

第1図、第2図および第3図に、それぞれ

特開昭63-119500 (B)

あると推定される。

(h) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下空白

DS 4152、DP 4639 およびH部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ製03000 SWカラム使用、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5、0.9ml/分、標準物質アセトランT-10およびT-40)。

(i) 紫外吸収スペクトル

2mg/ml水溶液において220~340nmに最大吸収は認められない。

(j) 赤外線吸収スペクトル(KBr錠)

1240、840(肩)および810cm⁻¹に、環状多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸アセスフェートを介してメチルグリカン部の結合した環状化多糖体で

第4表

試料	用液 mg/100ml	体積上昇値 ml/100ml					
		75	375	15	75	15	75
DS 4152		0.20	0.20	0.10	0.15	0.15	0.45
DP 4639		0.20	0.50	0.20	0.20	0.90	0.90
H部分		0.20	1.55	1.25	1.40	4.30	5.20
		0.20	1.40	2.00	1.80	5.20	5.80
		0.20	1.90	1.40	2.20	2.85	6.20
		0.20	1.80	1.75	2.65		

・+(陽性)・-(陰性)

(i) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000mg/kg以上であつた。

実施例1(加)

DP 4639 (0.0g)を300mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(41.8cm²、アミコン社製)を用いて、常圧で加圧(1.5kg/cm²)下、室温で膜外へ通した。上記膜を透過しながら透過液量が約3Lとなるまで実施した。透過液の濃縮液(約50ml)に100mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500mlのエタノール中へ攪拌下降下した。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(55℃、5時間)してDS 4152

特開昭63-119500 (9)

の白色粉末33%を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、
蛋白、S及びPの含量を除き、実施例1(A)の
DS 4152 と同一であつた。

糖含量 88%
S含量 11.3%
蛋白含量 0.9%
P含量 0.92%

高速ゲル透過クロマトグラムを第4図に示す
(0.3000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)、0.8 ml/分)。

実施例2

胎胚浸透膜血管新生阻止試験(直接法):
胎胚を用い、タイラーとフォークマン
(Nature 297:307, (1982))の方法を—

べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン
を0.5 μ g/胎胚の量(血管新生に影響のない量)
を用いた。また、比較として、DP 4639
及びH成分についてもその活性を調べた。この
結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID_{50} 値)

	DS 4152	DP 4639	H成分
ID_{50} 値 (μ g/胎胚)	3	30	600

実施例4

実施例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152 の併用による ID_{50} 値の変化を検討した。
この結果、種々のステロイドに10

部改良した以下の方法で行つた。

鶏(ノーリンクロス)の4~5日胎受精卵
の浸透膜に、生理食塩水で溶解したDS 4152
又はヘパリンを添加し、37℃で培養した。
再培養後2日後に、浸透膜血管の発達度を
生理食塩水のみを添加した対照と比較し、
ロビット法により、50%血管新生阻止量
(ID_{50} 値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 の ID_{50} 値
は、160 μ gであつた。これに対し、ヘパ
リンは、100 μ gでも作用を示さなかつた。

実施例3

胎胚浸透膜血管新生阻止試験(直接法):
実施例2と同様にして、ステロイドと
DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152 を加えれば、それぞれの胎
胚浸透膜血管新生阻止活性が10~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID_{50} 値(μ g/embryo)	
	単 独	DS 4152 (増加) と併用 (倍数)
コルチゾンアセテート	120	017 (7.1倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (6.9)
プレドニゾン	130	008 (16.3)
6 α -メチルプレドニゾン	115	003 (38.3)
ベタメタゾン	080	005 (16.0)
テトラヒドロ3	100	001 (100.0)
プロゲステロン	102	049 (2.1)
メトキシプロゲステロン アセテート	112	042 (2.7)
17 β -エストラジオール	198	028 (7.0)
フルオキシメステロン	124	012 (10.3)
5 α -アンドロスタン	232	029 (8)

特開昭63-119500 (10)

この結果から明らかのように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (ex vivo 法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を5mg/kgの割合で用い、DS 4152 は30mg/kg又は300mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較として DP 4639 及びE 画分を用いた。この結果を第8表に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した皮下鼠血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

実施例5

血管新生阻止作用 (ex vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313%タエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日齢受胎期皮下鼠血管に添加し、2日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

第8表

投与ルート	DS 4152	DP 4639	E 画分
皮下	922%	833%	868%
経口	927%	888%	828%

酢酸コルチゾンで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受胎期皮下鼠血管に加え、2日後に血管新生に及ぼす効果を判定した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウスと、6時間経過後の血液を加えた場合の皮下鼠血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第9表の通りである。

DS 4152 および DP 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても皮下鼠血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (ex vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与6時間後に採血し、0.313%タエン

以下余白

表 9

薬剤名 (ルート)	スチロイル		DS 4152投与量 (mg/kg; p.o.)	血中新生阻止率 (%)
	投与量 (mg/kg)	投与回数 (p.o.)		
コナソリンアセテート (p.o.)	0	0	0	27
			30	75.1
ナトロン (p.o.)	1	0	0	-26
			30	71.7
ナトロン (p.o.)	0	0	0	-123
			30	60.7
エトキシスチロール (i.m.)	0	0	0	40
			30	52
			30	18.4
			30	23.4
	100	0	0	24.2
			30	37.6

実施例 8

沈着試験:

C57BL/6雄マウスに同系の卵巣由来の
水腫腫瘍M5076を 1×10^6 個皮下接種し、5
日目よりDS 4152を30mg/kg、1日1回
6回皮下投与したところ、著大な沈着効果
と生存日数の有意な延長が認められた。すな
わち第10表に示すように移植21日目の腫
瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制)
であり、かつメチアン生存日数が対照群よ
り33%延長した。

・腫瘍平均重量は、腫瘍長の長軸と短軸の長
さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例 9

沈着試験:

ICR系雄マウス (5週齢) にアルコーマ
180 (180) を 1×10^6 個皮下接種
し、3日目より酢酸コルチゾンの生理食塩水
懸濁液を250mg/kg/日の割合で3日間、
100mg/kg/日の割合で1日投与した。
DS 4152は生理食塩水に溶解し、0.61
もしくは0.1mg/kgとなる濃度1日1回皮
下もしくは腹腔にて4日間投与した。移植7
日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したと
ころ第11表に示す如く酢酸コルチゾンのみ
を投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与
群と差がなかったが、さらにDS 4152を投
与することにより顕著な増殖阻止作用が得ら

表 10

腫瘍系	群	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 (mg)	生存率 (%)
M5076	対照群	0	230±0.18 (100)	0
	DS 4152 投与群	30	089±0.09 (37)	33

(a) 移植21日目の平均腫瘍重量±標準誤差、(b) は平均生存日数。

(c) (a) 腫瘍重量と生存日数のメチアン生存日数/対照群のメチアン生存日数-1) $\times 100$

れ、対照群の腫瘍重量の69~175%であった。

表11 質

処 理	腫瘍重量	
	平均値±標準誤差	T/C%
生理食塩水 (p.o.)	Q361±Q191	1000
生理食塩水 (i.p.)	Q391±Q122	1000
酢酸コルチゾン	Q340±Q162	942
DS 4152 (Q61mg/mouse p.o.)	Q361±Q070	1000
DS 4152 (Q1mg/mouse p.o.)	Q261±Q077	723
DS 4152 (Q61mg/mouse p.o.) + 酢酸コルチゾン	Q063±Q018	175*
DS 4152 (Q1mg/mouse p.o.) + 酢酸コルチゾン	Q028±Q011	74*
DS 4152 (Q61mg/mouse i.p.)	Q322±Q071	824
DS 4152 (Q1mg/mouse i.p.)	Q355±Q115	908
DS 4152 (Q61mg/mouse i.p.) + 酢酸コルチゾン	Q063±Q036	161**
DS 4152 (Q1mg/mouse i.p.) + 酢酸コルチゾン	Q035±Q015	69**

* P<0.05, ** P<0.01 スチューデントt-検定による

投与し注射剤とする。

実施例12

調剤：

DS 4152 6mg、プレドニゾン20mg、乳糖50mg、トクモロコシゲンブリン155mg、カルシウムメタセロースカルシウム5mg、ヒドロキシプロピルセルロース3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従って混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図をいし第4図は高速ゲル濾過クロマトグラムである。

以 上

実施例10

調剤剤：

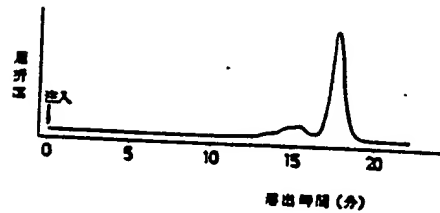
DS 4152 6mg、乳糖300mg、トクモロコシゲンブリン144mg、カルシウムメタセロースカルシウム30mg及びヒドロキシプロピルセルロース20mgを用い、常法に従って500mgの調剤剤を調製した。この調剤剤は錠状にもわけて1850.0mg~5mgを服用する。

実施例11

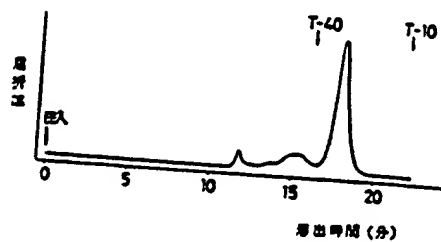
注射剤：

DS 4152 12mg、塩化ナトリウム90mgを注射用滅菌水に溶解し、1.0mlとする。この溶液をメンブランフィルターで濾過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

第1図

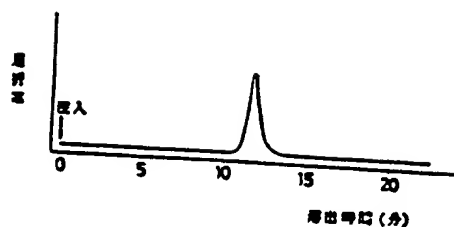


第2図

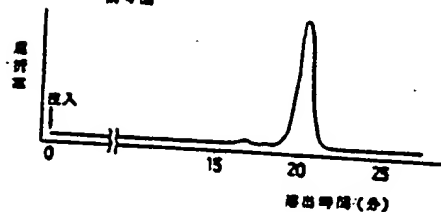


特開昭63-119500 (13)

第3図



第4図



第1頁の続き

④Int.Cl.⁴

A 61 K 31/725
37/02
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04
// (A 61 K 31/725-
31:56)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

⑥発明者 小河 秀正

秀正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内